


In vitro preparation of homologous heart valves, useful for replacement of diseased valves, by inoculating biodegradable carrier with fibroblasts and attachment to a non-degradable stent

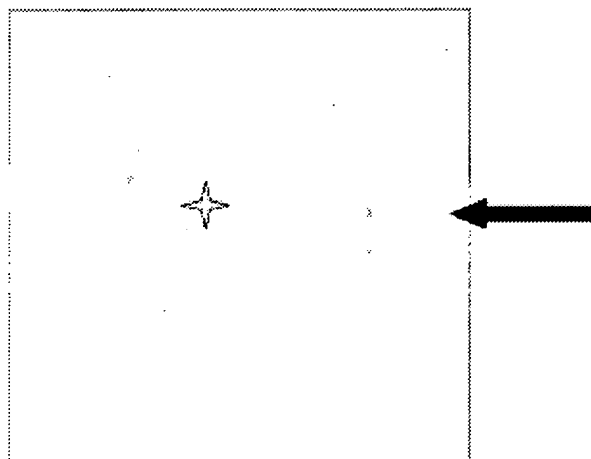
Patent number: DE10235237
Publication date: 2004-02-12
Inventor: HOERSTRUP SIMON PHILIPP (CH); ZUEND GREGOR (CH)
Applicant: SYMETIS AG ZUERICH (CH)
Classification:
- international: C12N5/08; A61L27/50; A61F2/24
- european: A61L31/00F, A61F2/24D2, A61L27/18, A61L27/38
Application number: DE20021035237 20020801
Priority number(s): DE20021035237 20020801

Also published as:

 WO2004018008 (A1)

Abstract of DE10235237

An in vitro method for preparing homologous heart valves (A), is new. An in vitro method for preparing homologous heart valves (A) comprises: (a) preparation of a biodegradable carrier (scaffold); (b) seeding the carrier with homologous fibroblasts and/or myofibroblasts to form a connective tissue matrix; (c) optionally seeding the matrix with endothelial cells and (d) fixing the matrix to a framework (stent) that is not (easily) degraded. The matrix, before and/or after fixing, is introduced into a pulsatile flow chamber and the flow rate in the chamber increased (dis) continuously. Independent claims are also included for: (1) similar method in which the carrier and stent are fixed together before seeding with cells; (2) autologous heart valves prepared by the method; and (3) autologous heart valves having a connective tissue inner structure, surrounded by a layer of endothelial cells and fixed to a stent.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

= WO 2004/018008 A1



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 35 237 A1** 2004.02.12

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **102 35 237.2**
(22) Anmeldetag: **01.08.2002**
(43) Offenlegungstag: **12.02.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 5/08**
A61L 27/50, A61F 2/24

(71) Anmelder:
Symetis AG, Zürich, CH

(72) Erfinder:
**Hoerstrup, Simon Philipp, Zürich, CH; Zünd,
Gregor, Herrliberg, CH**

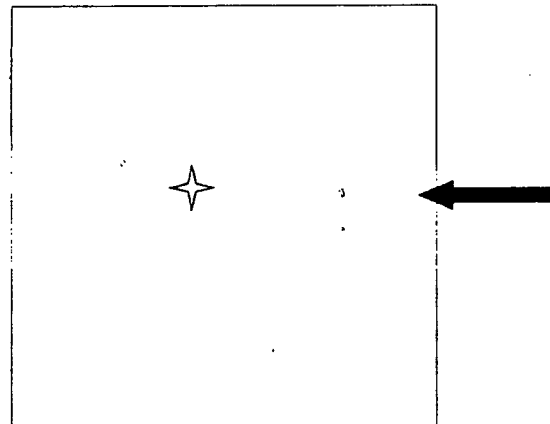
(74) Vertreter:
**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **In-vitro-Verfahren zum Herstellen einer homologen "gestenteten" Tissue eingeeierten Herzklappe**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein in vitro-Verfahren zum Herstellen einer homologen "gestenteten" Tissue eingeeierten Herzklappe.



Beschreibung

[0001] Jedes Jahr versterben alleine in den USA ca. 20.000 Patienten an den Folgen einer Herzklappendysfunktion, und mehr als 60.000 Patienten sind wegen einer bereits erkannten Dysfunktion gezwungen, ein oder mehrere Herzklappen operativ ersetzen zu lassen. Als Ersatz für die eigene Herzklappe kommen entweder mechanische oder biologische Klappenprothesen (Xenografts) in Frage, seltener werden kryopreservierte oder glutaraldehydfixierte Homografts verwendet.

Stand der Technik

[0002] Mechanische Klappenprothesen führen jedoch oft zu Fremdkörperreaktionen mit thromboembolischen Komplikationen, die durch die mit der künstlichen Herzklappe veränderten Strömungsverhältnisse im Herzen begünstigt werden. Daher ist eine lebenslange Antikoagulation des betroffenen Patienten erforderlich, die zu einer permanent erhöhten Blutungsgefahr führt. Eine weitere, oft lebensbedrohliche Komplikation bei Patienten mit einer mechanischen Herzklappe sind Infektionen.

[0003] Bei den Xenografts handelt es sich meistens um Schweineklappen, die mit Glutaraldehyd behandelt sind. Schweineklappenprothesen können mit guten Ergebnissen bei älteren Patienten eingesetzt werden, neigen aber zur Degeneration nach nur ca. 12 bis 15 Jahren, so dass sie für junge Leute in der Regel nicht in Frage kommen. Weiterhin besteht bei Schweineklappenprothesen im Vergleich zum gesunden Herzen eine erhöhte Infektionsgefahr. Darüber hinaus neigen Schweineklappen zur Kalzifizierung, weshalb sie zum Einsatz bei Kindern und jungen Leuten, die einen erhöhten Calciumstoffwechsel aufweisen, ungeeignet sind. Schließlich stellen sie ebenfalls körperfremdes Gewebe dar, das mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vom körpereigenen Immunsystem als fremd erkannt wird und damit adverse Immunprozesse auslösen kann.

[0004] Als dritte Möglichkeit stehen Homografts; d. h. aus humanen Spendern isolierte, fixierte Herzklappen, zur Verfügung. Homografts sind zwar gegen Infektionen relativ resistent, stellen jedoch ebenfalls körperfremdes Gewebe dar, das mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit Immunreaktionen hervorruft. Darüber hinaus neigen Homografts ebenso wie Schweineklappenprothesen zur Kalzifizierung und unterliegen daher einer erheblichen Degeneration, die in der Regel eine Reoperation nach 7 bis 12 Jahren erforderlich macht. Homografts stehen darüber hinaus in nur äußerst begrenztem Umfang zur Verfügung.

[0005] Neben den bereits beschriebenen Nachteilen der bisher als Klappenersatz verwendeten Klappenprothesen, d. h. der Auslösung von Immunreaktionen, der erhöhten Infektionsgefahr, der Gefahr thromboembolischer Prozesse und der Degenerationsneigung, ist allen bisher bekannten Klappen ge-

meinsam, dass sie aus anorganischem Material oder fixiertem organischen Material bestehen und ihnen daher wichtige Eigenschaften lebender Matrix, z. B. die Fähigkeit zu Reparationsprozessen, zur Rekonfiguration oder zum Wachstum fehlen. Daraus folgt u. a., dass bei kindlichen Klappenpatienten bisher regelmäßig Reoperationen in Kauf genommen werden mussten. Zusätzlich zu dem jeder Herzoperation inhärenten Risiko steigt jedoch mit jeder Reoperation das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko, da durch die vorangegangenen Operationen erhebliche Verwachsungen im Thorax auftreten.

[0006] Es besteht daher ein dringender Bedarf für einen Herzklappenersatz, der die zuvor beschriebenen Nachteile vermeidet. Zu diesem Zweck ist bereits vorgeschlagen worden, künstliche Herzklappen durch „Tissue Engineering“ herzustellen. Das „Tissue Engineering“ befasst sich mit der Entwicklung „biohybrider“ Implantate, die im Körper zu Geweben oder gar zu ganzen Organsystemen heranwachsen. Auch die Herstellung biohybrider Herzklappen in Form von einzelnen Klappensegeln ist bereits beschrieben worden; die durch „Tissue Engineering“ hergestellten Herzklappensegel hatten jedoch bisher den Nachteil, dass sie inadäquate, nicht ausreichende bindegewebige Strukturen aufwiesen und daher den im Herzen herrschenden Strömungsverhältnissen nach Auflösung der biodegradablen Trägerstruktur nicht hätten standhalten können.

[0007] DE 19919625 beschreibt ein in vitro-Verfahren zum Herstellen einer homologen Herzklappe. Die dort beschriebene Herzklappe baut auf einem biologisch abbaubaren Träger auf, der mit homologen Fibroblasten und/oder Myofibroblasten zur Ausbildung einer bindegewebsähnlichen Matrix inkubiert und dann mit Endothelzellen besiedelt wird. Die bindegewebsähnliche Matrix wird dann anschließend zur Gewebereifung in einen Bioreaktor überführt. Diese Herzklappe ist den Strömungsverhältnissen im menschlichen Körper bestens angepasst. Die in DE 19919625 beschriebene Herzklappe besteht zum Zeitpunkt ihrer Implantation fast vollständig aus autologem Zellmaterial, das dann in das Empfängerherz eingenäht wird. Ein Nachteil dieser Herzklappe könnte unter Umständen sein, dass die chirurgische Implantation technisch schwierig durchführbar ist. Außerdem könnte ein Problem entstehen, wenn die Naht durch das einzunähende autologe, tissue-engineerte Gewebe geführt werden muss. Aufgrund der extrem hohen Belastung, der die Herzklappe anschließend im menschlichen Körper ausgesetzt ist, könnte es im Bereich der Naht zu Rissen kommen.

Aufgabenstellung

[0008] Aufgabe der Erfindung ist es daher, verbesserte homologe Herzklappen sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung zur Verfügung zu stellen.

[0009] Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch ein in vitro-Verfahren zum Herstellen einer homolo-

gen Herzklappe gelöst, das die folgenden Schritte umfasst:

- Bereitstellen eines biologisch abbaubaren Trägers (Scaffold),
- Besiedeln des Trägers mit homologen Fibroblasten und/oder Myofibroblasten zur Ausbildung einer bindegewebigen Matrix,
- ggfls. Besiedeln der bindegewebigen Matrix mit Endothelzellen
- Befestigen der bindegewebigen Matrix auf einer nicht oder schwer abbaubaren Rahmenkonstruktion (Stent),

wobei die ggfls. mit Endothelzellen besiedelte bindegewebige Matrix vor oder nach der Befestigung auf der Rahmenkonstruktion in eine pulsatile Flusskammer, in der sie steigenden Flussraten ausgesetzt werden kann, eingebracht wird, und die Flussrate kontinuierlich oder diskontinuierlich erhöht wird.

[0010] In einem alternativen Verfahren wird eine homologe Herzklappe hergestellt durch

- Bereitstellen eines biologisch abbaubaren Trägers (Scaffold), der mit einer nichtabbaubaren Rahmenkonstruktion (Stent) fest verbunden ist,
- Besiedeln des Trägers mit homologen Fibroblasten und/oder Myofibroblasten zur Ausbildung einer bindegewebigen Matrix,
- ggfls. Besiedeln der bindegewebigen Matrix mit Endothelzellen
- Einbringen der Rahmenkonstruktion mit der damit verbundenen bindegewebigen Matrix in eine pulsatile Flusskammer, in der sie steigenden Flussraten ausgesetzt werden kann,
- kontinuierliches oder diskontinuierliches Erhöhen der Flussrate.

[0011] Mit den erfindungsgemäßen Verfahren können homologe Herzklappen hergestellt werden, die sämtliche Vorteile der aus der DE 19919625 bekannten Herzklappe aufweisen und überdies vermeiden, dass zum Zeitpunkt der Implantation der Klappe eine Naht durch die bindegewebigen Strukturen der Herzklappe geführt werden muss. Sie sind den im Körper herrschenden Strömungsverhältnissen gewachsen und einfach chirurgisch implantierbar.

[0012] Die Verfahren zum Herstellen der erfindungsgemäßen Herzklappe sowie die dadurch hergestellte Herzklappe sollen im Folgenden näher erläutert werden.

[0013] In der folgenden Beschreibung bedeutet der Terminus „Träger“ eine azelluläre Struktur, die, wie unten genauer erläutert wird, entweder aus synthetischen Fasern oder einem azellulären Bindegewebsgerüst gebildet ist. Der Begriff „Matrix“ bezeichnet eine bindegewebige Struktur, die neben Fibroblasten und Myofibroblasten typische Bestandteile einer Extrazellulärmatrix, nämlich Kollagen, Elastin und Glycosaminoglycane enthält. Mit Matrix bezeichnete Strukturen enthalten typischerweise im Abbau begriffene Trägerbestandteile oder gar keine Trägerbe-

standteile mehr.

[0014] Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zunächst ein biologisch abbaubarer Träger bereitgestellt. Das Trägermaterial soll dabei einerseits eine gewisse Zeitlang stabil sein, um eine ausreichende Besiedlung bzw. Durchdringung mit Fibroblasten und/oder Myofibroblasten zu ermöglichen und die Ausbildung einer bindegewebigen Matrix erreichen zu können, andererseits innerhalb einer vertretbaren Zeit, die Idealerweise kleiner ist, als die Zeit, die die Bildung der homologen Klappenprothese in Anspruch nimmt, insgesamt aufgelöst werden können. Es ist bevorzugt, dass der Abbau nach ca. 8 Tagen beginnt; er sollte in der Regel in weniger als 3 Monaten, bevorzugt schon nach 4 bis 6 Wochen abgeschlossen sein.

[0015] Nach Ausbildung einer soliden bindegewebigen Matrix-Struktur, deren abbaubarer Träger noch nicht aufgelöst zu sein braucht, wird diese ggfls. mit Endothelzellen besiedelt. Nach erfolgter Besiedlung wird die bindegewebige Matrix auf eine nicht oder schwer abbaubare Rahmenkonstruktion eingebracht. Alternativ kann jedoch ein bereits mit einer Rahmenkonstruktion fest verbundener Träger den Besiedlungsschritten unterworfen werden. Die möglichen alternativen Verfahrensvarianten sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

[0016] In einer Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der biologisch abbaubare Träger (Scaffold) zunächst mit homologen Fibroblasten und/oder Myofibroblasten zur Ausbildung einer bindegewebigen Matrix besiedelt werden. Anschließend wird die Matrix ggfls. mit Endothelzellen besiedelt. Erfindungsgemäß kann die vorgebildete herzkappenanaloge Struktur nun in einem weiteren Verfahrensschritt zur Gewebereifung und Optimierung der hämodynamischen Funktion in eine pulsatile Flusskammer eingebracht werden, in der sie steigenden Flussraten ausgesetzt werden kann. Durch kontinuierliches oder diskontinuierliches Erhöhen der Flussrate wird sie dabei an die Strömungsverhältnisse im menschlichen Körper adaptiert. Zur weiteren Stabilisierung wird die herzkappenanaloge Struktur auf einer biokompatiblen Rahmenkonstruktion aus nicht oder schwer abbaubarem Material befestigt, die ggfls. nochmals in die pulsatile Flusskammer eingesetzt wird. In dem Fall, dass nach Befestigung auf der Rahmenkonstruktion in der Flusskammer an die Strömungsbedingungen im menschlichen Herzen adaptiert wird, kann die erste Inkubation in der pulsatischen Flusskammer ausgelassen werden. Durch diese Verfahren werden vitale Herzklappenprothesen erhalten, die den Strömungsverhältnissen im menschlichen Körper gewachsen sind.

[0017] In einer alternativen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der biologisch abbaubare Träger (Scaffold) mit der nicht oder schwer abbaubaren Rahmenkonstruktion (Stent) bereits vor der Besiedlung fest verbunden werden. In einem weiteren Schritt wird dann der mit der Rahmenkonstruktion

verbundene Träger zur Ausbildung einer bindegewebigen Matrix mit homologen Fibroblasten und/oder Myofibroblasten und anschließend ggfls. mit Endothelzellen besiedelt. Zur Gewebereifung und Optimierung der hämodynamischen Funktion wird die vorgebildete herzklappenanalogen Struktur anschließend in eine pulsatile Flusskammer eingebracht, in der sie steigenden Flussraten ausgesetzt werden kann. Durch kontinuierliches oder diskontinuierliches Erhöhen der Flussrate wird dabei ebenfalls eine vitale Herzklappenprothese erhalten, die den Strömungsverhältnissen im menschlichen Körper gewachsen ist.

[0018] Insgesamt ergeben sich also die folgenden Verfahrensvarianten:

Variante 1

- Bereitstellen eines Trägers ohne Rahmenkonstruktion
- Besiedeln
- Adaptieren in einer pulsatischen Flusskammer
- Befestigen auf einer nicht oder schwer abbaubaren Rahmenkonstruktion (Stent)
- ggfls. Nachadaptieren der „gestenteten“ Herzklappe

Variante 2

- Bereitstellen eines Trägers ohne Rahmenkonstruktion
- Besiedeln
- Befestigen auf einer nicht oder schwer abbaubaren Rahmenkonstruktion (Stent)
- Adaptieren der „gestenteten“ Herzklappe

Variante 3

- Bereitstellen eines Trägers auf einer nicht oder schwer abbaubaren Rahmenkonstruktion
- Besiedeln
- Adaptieren

[0019] Bei dem Trägermaterial handelt es sich bevorzugt um eine aus Polymerfasern aufgebaute Struktur, um eine poröse Polymerstruktur oder ein azelluläres biologisches Gewebe. Geeignete synthetische Polymere für diese Verwendung schließen bioerodierbare Polymere mit ein, wie z. B. Polyglykolsäure (PGA), Polymilchsäure (PLA), Polyhydroxyalkanoat (PHA) und Poly-4-Hydroxybutyrat (P4HB), Polycaprolactone (PLGA), Polycarbonate, Polyamide, Polyanhydride, Polyaminosäuren, Polyorthoester, Polyacetate, Polycyanoacrylate sowie abbaubare Polyurethane und nicht erodierbare Polymere wie Polyacrylate, Ethylenvinylacetat-Polymere und andere substituierte Zelluloseacetate sowie Derivate davon. Polyester werden hierbei bevorzugt.

[0020] Bevorzugte biologisch abbaubare Polymere, die aus umfassen Polymere folgender Gruppe aus-

gewählt sind: Polyester der Hydroxycarboxysäuren, Polyanhydride der Dicarboxyester, und Copolymere der Hydroxycarboxysäuren und der Dicarboxyester.

[0021] In einer weiteren Ausführungsform besteht das Material aus einem synthetischen Polymer aus mindestens einem der folgenden Monomere: Glykolid, Laktid, p-Dioxanon, Caprolacton, Trimethylencarbonat, Butyrolacton. In besonderen Ausführungsformen wird das Material ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus Polymeren oder Copolymeren von Glykolsäure, Milchsäure und Sebacinsäure. Polyglykolsäurepolymere werden hierbei bevorzugt.

[0022] Diese Polymere können sowohl rein als auch in Mischungen aus zwei oder mehreren der genannten Substanzen oder Mischungen dieser Substanzen mit weiteren biologisch abbaubaren Polymeren verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Mischpolymer aus 85% PGA und 15% PLA verwendet.

[0023] In einer weiteren besonderen Ausführungsform wird der Träger aus einem Polyhydroxyalkanoat (PHA) hergestellt. PHA kann dabei mit einem weiteren nichtdegradierbaren Polymer beschichtet werden. Ein bevorzugtes Polyhydroxyalkanoat für diese Verwendung degradiert in vivo innerhalb von weniger als 9 Monaten, noch bevorzugter in weniger als 6 Monaten und am stärksten bevorzugt in weniger als 3 Monaten. Eine bevorzugte Zusammensetzung der Polyhydroxyalkanoate beinhaltet 2-, 3-, 4- oder 5-Hydroxysäuren, z. B. Poly-4-hydroxybutyrat. Weiterhin kann die Zusammensetzung ein Poly-4-hydroxybutyrat-co-3-hydroxybutyrat sowie Kombinationen davon beinhalten. Am stärksten bevorzugt wird dabei Poly-4-hydroxybutyrat.

[0024] In einer weiteren besonderen Ausführungsform besteht der Träger aus Homopolymeren und Copolymeren mit einer beliebigen Kombination folgender Monomere: 3-Hydroxybutyrat, 3-Hydroxyvalerat, 3-Hydroxypropionat, 2-Hydroxybutyrat, 4-Hydroxybutyrat, 4-Hydroxyvalerat, 3-Hydroxyhexanoat, 3-Hydroxyheptanoat, 3-Hydroxyoctanoat, 3-Hydroxynonanoat, 3-Hydroxytridecanoat, 3-Hydroxytetradecanoat, 3-Hydroxypentadecanoat, 3-Hydroxyhexadecanoat, 3-Hydroxyheptadecanoat und 3-Hydroxyoctadecanoat.

[0025] Es hat sich als sinnvoll erwiesen, biologisch abbaubare Träger mit einer Polymerdichte von ca. 40 bis 120 mg/cm³ zu verwenden. Unterhalb von 40 mg/cm³ ist das Polymergewebe zu labil, oberhalb von 120 mg/cm³ ist das Gewebe zu dicht, um das Eindringen von Fibroblasten innerhalb eines vertretbaren Zeitraums zuzulassen. In bevorzugten Ausführungsformen beträgt die Dichte des biologisch abbaubaren Trägers 50 bis 80 mg/cm³, besonders bevorzugt 70 mg/cm³. In der vorliegenden Erfindung wurde mit guten Ergebnissen ein polymerer Träger der Fa. Albany International Research, Mensville, MA, USA, mit einer Dichte von ca. 70 mg/cm³ verwendet, sowie ein polymerer Träger der Fa. TRANSOME INC., Palm Bay, FL, USA.

[0026] Die Fasern des Trägers können einen Durchmesser von 6 bis 20 µm haben, bevorzugt 10 bis 18 µm. Es sind jedoch auch Gewebe mit anderen Faserstärken denkbar, die jedoch einerseits dem Träger eine gewisse Stabilität verleihen müssen, andererseits die Besiedelung und Durchdringung des Trägers mit Fibroblasten oder Myofibroblasten zulassen müssen. Für poröse (schwammartige) Polymerformen haben sich Porengrößen von 80 – 240 µm als günstig erwiesen. Die Poren können durch die sogenannte „Salt-Leaching“ Technik erzielt werden, die dem Fachmann bekannt ist.

[0027] Statt eines synthetischen Trägers, wie zuvor beschrieben, ist die Verwendung eines azellulären Bindegewebsgerüsts denkbar. So könnte beispielsweise eine Schweineklappe in ein immunologisch neutrales Gewebe umgewandelt werden (Bader et al., Eur. J.-Cardiothorac. Surg. 14, 279, 1998), das anschließend mit homologen Zellen besiedelt werden könnte. Auch humane Herzklappen können nach Neutralisierung wieder besiedelt werden.

[0028] Der biologisch abbaubare Träger wird zunächst mit einer Fibroblastenpopulation inkubiert. Bei Verwendung homologer Fibroblasten und/oder Myofibroblasten, d. h. von Fibroblasten und/oder Myofibroblasten aus einem Menschen, aber nicht unbedingt dem Patienten, sollte auf gleiche HLA-Typisierung geachtet werden. Fibroblastenpopulationen können dabei z. B. aus peripheren Blutgefäßen, sowohl Arterien als auch Venen, gewonnen werden. Hierzu bietet sich insbesondere die Arteria radialis des Unterarmes an, die wegen der arteriellen Doppelversorgung des Armes in den meisten Fällen zur schadlosen Explantation zur Verfügung steht. Alternativ können Gefäßzellen aus Blutgefäßen des Beines, z. B. der Vena saphena gewonnen werden. Weiterhin können die Myofibroblasten und Endothelzellen aus Knochenmarks-Vorläuferzellen oder aus pluripotenten Stammzellen oder genetisch manipulierten Zellen gewonnen werden.

[0029] Die Zellen können beispielsweise aus Gefäßfragmenten gewonnen werden, in dem die Gewebestückchen zunächst, wie in Zünd et al. (Eur. J. Cardiothorac Surg. 13, 160, 1998) beschrieben, in Gewebestückchen zerstückelt und ca. 1 bis 2 Wochen unter normalen Zellkulturbedingungen (37°C, 5 CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert werden, bis die Zellen auf dem Boden der Kulturschale eine konfluente Zellschicht bilden. Anschließend werden sie mehrfachen Passagen unterworfen, um eine von restlichem Gewebematerial freie Zellkultur zu erhalten. Nach zwei bis drei Passagen können die gemischten Zellpopulationen gereinigt werden, in dem sie mit einem für Endothelzellen spezifischen Fluoreszenzmarker (Dil-Ac-LDL, von Medical Technologies Inc., Stoughton, MA) inkubiert werden und mittels Durchflußzytometrie (FACStar Plus, Becton Dickinson) getrennt werden. Fluoreszenzmarkierte Zellen sind Endothelzellen, nicht markierte Zellen sind Fibroblasten und Myofibroblasten. Diese werden weitere zwei bis drei

Wochen kultiviert und während dieser Zeit zwei bis vier Passagen unterworfen, um eine ausreichende Anzahl an Zellen für die anschließende Besiedelung des Trägers zu erhalten.

[0030] Eine wie beschrieben gereinigte oder jede andere reine Fibroblasten/Myofibroblastenkultur kann nunmehr zur Besiedelung des Polymerträgers eingesetzt werden. Dazu werden pro Quadratmeter Oberfläche des Trägers ca. 10⁵ bis 6 × 10⁸ Fibroblasten und/oder Myofibroblasten eingesetzt. Unter „Oberfläche“ ist in diesem Fall nicht die tatsächliche Oberfläche des Polymers, sondern die bei Betrachtung des Trägers von oben in einer Ebene erkennbare Fläche gemeint. Üblicherweise wird den Fibroblasten 60 bis 90 min. Zeit gegeben, um sich an den Träger anzuheften. Anschließend kann das überstehende Medium entfernt werden und ein weiteres Mal Fibroblastensuspension zugegeben werden. Idealerweise lässt man jedoch zwischen der ersten und zweiten Zugabe von Fibroblastensuspension 2 bis 36 Stunden, bevorzugt 24 Stunden verstreichen.

[0031] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden dem Träger bzw. sich der nach der erstmaligen Fibroblastenzugabe allmählich ausbildenden Matrix weitere 3 bis 14 mal, besonders bevorzugt 5 bis 10 mal Fibroblasten und/oder Myofibroblasten zugefügt.

[0032] Unter den üblicherweise für das Zellwachstum von Fibroblasten verwendeten Bedingungen (z. B. 5% CO₂, Inkubation bei 37°C, steriles Medium) entwickelt sich nach ca. ein bis drei Wochen eine solide bindegewebige Struktur. In einer bevorzugten Ausführungsform wird diese Struktur anschließend mit einer reinen Endothelzell-Suspension inkubiert. Die Endothelzellen können genauso wie die Fibroblasten durch FACS angereichert und anschließend in mehreren Passagen (bevorzugt 3) expandiert werden. Auch für Endothelzellen ist es bevorzugt, die Besiedelung mit jeweils ca. 10⁵ bis 5 × 10⁸ Endothelzellen mehrfach zu wiederholen, z. B. 3 bis 14 mal. In bevorzugten Ausführungsformen wird die Besiedelung mit Endothelzellen 5 bis 10 mal wiederholt. Zwischen zwei Besiedelungsschritten sollten mindestens 60 min., bevorzugt jedoch 2 bis 24 Stunden liegen. Der Endothelzellbesiedelungsschritt ist jedoch optional.

[0033] Bei den zum Besiedeln des Trägers verwendeten Zellen handelt es sich bevorzugt um humane Zellen. Besonders bevorzugt ist es jedoch, autologe Fibroblasten und/oder Myofibroblasten sowie ggfls. Endothelzellen zu verwenden. Dazu wird dem Patienten, dessen Herzklappe ersetzt werden soll, Gewebe z. B. aus einem seiner Gefäße entnommen. Wie oben bereits erwähnt, bieten sich dazu die Arteria radialis sowie die Vena saphena oder Knochenmark an. Die Verwendung der autologen Zellen zur Konstruktion der Herzklappe hat den wesentlichen Vorteil, dass die Klappe nach Implantation in den Patienten kein körperfremdes Gewebe darstellt und somit Immunreaktionen gegen die künstliche Herzklap-

pe so gut wie ausgeschlossen erscheinen.

[0034] Ca. 14 Tage nach der optionalen Zugabe der Endothelzellen lässt sich histologisch und immunhistochemisch ein Gewebe mit einem superfiziellen Einzelzellschicht aus Endothelzellen und einer bindegewebigen Grundstruktur nachweisen.

[0035] In einer bevorzugten Ausführungsform hat die bindegewebige Matrix die Form einer Herzklappe und ist mit einem breiten bindegewebigen Rand, dem sogenannten Nahtring versehen, der auf einer kreisförmigen Rahmenkonstruktion fixiert wird. Ein Beispiel für eine solche Herzklappe mit Nahtring ist in **Abb. 1** gezeigt.

[0036] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die bindegewebige Matrix die Form eines Bandes oder eines Ringes. Diese Ausführungsform erfordert einen Nahtring, der mit einer dreizipfeligen Stützstruktur versehen ist, als Rahmenkonstruktion. Das Band bzw. der Ring wird dann um diese dreizipfelige Struktur herumgeführt. Ein Beispiel für diese Ausführungsform ist in **Abb. 3** dargestellt. Der Durchmesser der Rahmenkonstruktion ist dabei individuell wählbar und richtet sich nach den anatomischen Erfordernissen des Patienten.

[0037] Die erfindungsgemäße Rahmenkonstruktion (Stent) kann aus verschiedenen Materialien aufgebaut sein. Um dem neu hergestellten Gewebe eine möglichst lange Lebensdauer und Festigkeit zu verleihen, sollte das Material aus nicht abbaubarem biokompatiblen oder alternativ aus schwer abbaubarem biokompatiblen Material aufgebaut sein, z. B. Karbon, PTFE, Dacron, Metall, PHA, bevorzugt Poly-3-Hydroxybutyrat (P3HB). „Schwer abbaubar“ bedeutet dabei eine Abbaudauer von mehr als einem Jahr.

[0038] Die Befestigung der bindegewebigen Matrix auf der Rahmenkonstruktion kann durch konventionelle Nahttechnik erfolgen. In einer Ausführungsform kann die Matrix mittels Fibrinkleber auf der Rahmenkonstruktion fixiert werden. Besonders bevorzugt erfolgt die Befestigung der bindegewebigen Matrix auf dem Träger durch konventionelle Nahttechnik in Verbindung mit Fibrinkleber. Die Form der einzelnen Herzklappensegel kann ebenso entweder durch eine Naht oder durch Verkleben mit Fibrinkleber stabilisiert werden, in dem die über die Zipfelspitzen in Richtung des Kreismittelpunktes umlaufenden Ränder vernäht bzw. verklebt werden.

[0039] Erfindungsgemäß kann nun in einem weiteren Verfahrensschritt die vorgebildete herzklappenanaloge Struktur in eine pulsatile Flusskammer eingebracht werden, in der sie steigenden Flussraten ausgesetzt werden kann. Es wurde festgestellt, dass durch eine langsame Adaptation der Flussraten die Bildung einer strömungsbeständigen bindegewebigen Matrix erreicht werden kann.

[0040] Zum Durchführen des erfindungsgemäßen Verfahrens eignet sich z. B. der in der DE 19919625 beschriebene Bioreaktor.

[0041] In einer Ausführungsform der Erfindung wer-

den Flussraten zwischen 5 ml/min. und 8000 ml/min., bevorzugt zwischen 30 ml/min. und 5000 ml/min., besonders bevorzugt 50 ml/min. bis 2000 ml/min verwendet. Die Angaben beziehen sich auf den Fluss durch die Klappenprothese. Als anfängliche Flussrate haben sich Flussraten von 50 bis 100 ml/min. als geeignet erwiesen. Diese Flussraten werden z. B. mit einer Pulsfrequenz von 5 bis 10 Pulsen pro Minute durch die Herzklappe geschickt. Die Flussrate wird anschließend kontinuierlich oder diskontinuierlich auf bis zu 5000 ml/min. gesteigert. Gleichzeitig wird die Pulsfrequenz auf bis zu 180 Pulse/min. angehoben. Bei den angegebenen Daten handelt es sich um die Grenzwerte, die normalerweise nicht überschritten werden.

[0042] In bevorzugten Ausführungsformen wird die Flussrate bis auf 2000 ml/min gesteigert, während die Pulsfrequenz auf 70 bis 100, bevorzugt 80 Pulse/min. angehoben wird. Die Belastung der sich stabilisierenden Herzklappe wird damit nahezu physiologischen Verhältnissen angepasst. Es hat sich als günstig, aber nicht notwendig erwiesen, die Flussrate und die Pulsfrequenz jeweils nach ca. 24 bis 48 Stunden zu steigern. So kann beispielsweise, ausgehend von einer Flussrate von 50 bis 100 ml/min und einer Pulsrate von 5 bis 10 Pulsen/min. am Tag 1 des Aufenthaltes in der pulsatilen Flusskammer, am Tag 3 eine Erhöhung auf 300 ml/min bei 20 bis 25 Pulsen/min, am Tag 5 auf 700 ml/min. und 35 bis 45 Pulsen/min, am Tag 7 auf 1000 ml/min und 50 bis 60 Pulsen/min, am Tag 9 auf 1300 ml/min und 70 bis 80 Pulsen/min., am Tag 11 auf 1500 ml/min. und ca. 100 Pulsen/min, am Tag 13 auf 1750 ml/min und ca. 120 Pulsen/min und am Tag 15 auf 2000 ml/min und 140 Pulsen/min vorgesehen werden. Je nach zur Verfügung stehender Zeit, Größe der Klappe, Größe und Alter des Patienten etc., kann jedoch eine sehr viel langsamere Steigerung der Flussraten sowie der Pulsfrequenz oder die Steigerung auf höhere Flussraten und Pulsfrequenzen sinnvoll sein.

[0043] In einer Ausführungsform der Erfindung werden die in der pulsatilen Flusskammer herrschenden systemischen Drücke auf 10 bis 240 mmHg eingestellt. Bevorzugt sind systemische Drücke von 60 bis 140, besonders bevorzugt sind systemische Drücke von 80 bis 120 mm Hg.

[0044] Die mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellte homologe bzw. autologe Herzklappe weist gegenüber den herkömmlichen mechanischen und biologischen Herzklappen wesentliche Vorteile auf. So besteht die erfindungsgemäße Herzklappe in ihrer bevorzugten Ausführungsform aus autologen Gewebe, d. h. aus Gewebe des zur Herzklappenoperation anstehenden Patienten, sowie aus einem weiter stabilisierenden biokompatiblen Material, das als Rahmenkonstruktion verwendet wird. Dadurch wird eine Fremdkörperreaktion des Klappenempfängers auf das Implantat vermieden. Die Infektionsgefahr bei Empfängern einer erfindungsgemäßen Herzklappe ist somit erheblich reduziert. Eine

Antikoagulationstherapie ist nicht erforderlich; damit entfällt die Gefahr hämorrhagischer Komplikationen. Der bei weitem überzeugendste Vorteil der erfindungsgemäßen Herzklappe ist jedoch die Tatsache, dass sie lebendes Gewebe darstellt und daher nach Implantation zu permanenter Regeneration und Reparatur befähigt ist. Weiterhin vereint die erfindungsgemäße Herzklappe in ihrer bevorzugten Ausführungsform die Vorteile einer vollkommen autologen Herzklappenprothese und die sehr guten hämodynamischen Funktionen synthetischer Herzklappenprothesen. Letztendlich sind bei erfindungsgemäßen Herzklappen durch die Verwendung der biokompatiblen Rahmenkonstruktion auch bei längerer Verwendung deutlich weniger degenerative Veränderungen und/oder Dysfunktionen zu erwarten, was die Lebensdauer der Herzklappe deutlich erhöht und damit das Risiko einer Reoperation deutlich herunternetzt.

[0045] Die erfindungsgemäße Herzklappe enthält eine bindegewebige innere Struktur, die neben Fibroblasten und Myofibroblasten im Wesentlichen Bestandteile einer normalen extrazellulären Matrix, nämlich Kollagen, Elastin und Glycosaminoglykane enthält. Damit weisen die erfindungsgemäßen Klappen einen der nativen Klappe bzw. dem nativen Klappenegel entsprechenden Anteil an Kollagen (26–60%), Elastin (2–15%) und Glycosaminoglykanen auf. Diese auf einem biologisch abbaubaren Träger (Scaffold) aufgebaute und mit Endothelzellen besiedelte bindegewebige innere Struktur wird durch eine biokompatible Rahmenkonstruktion weiter stabilisiert. Die Befestigung der bindegewebigen Struktur auf der biokompatiblen Rahmenkonstruktion erfolgt wie oben beschrieben. Eine solche Herzklappenprothese vereint in sich die Vorteile einer autologen Herzklappenprothese und die sehr gute chirurgische Implantierbarkeit und Funktion synthetischer Herzklappenprothesen.

[0046] Es konnte gezeigt werden, dass die erfindungsgemäßen Herzklappen Flussraten von mehr als 2000 ml/min., entsprechend den in einem erwachsenen Humanherzen herrschenden Flussverhältnissen, standhalten. Somit kann erfindungsgemäß eine autologe Herzklappe zur Verfügung gestellt werden, die bedingungslos zur Implantation in kindliche wie auch erwachsene Patienten geeignet ist.

Ausführungsbeispiel

[0047] Die folgenden Abbildungen und Beispiele erläutern die Erfindung.

[0048] **Abb. 1** zeigt einen aus einem Polymer vorgebildeten Träger (s. Stern) mit Nahtring (s. Pfeil) nach Besiedelung mit Fibroblasten/Myofibroblasten und Endothelzellen.

[0049] **Abb. 2** zeigt eine röhrenförmige besiedelte Matrix, aus der Ringe von 3,5 cm Breite geschnitten werden können, die um die in **Abb. 3** gezeigte Rahmenkonstruktion gelegt werden.

[0050] **Abb. 3** zeigt eine schematische Darstellung

der Rahmenkonstruktion aus **Abb. 3** mit um die dreizipfelige Stützstruktur geführter besiedelter Matrix.

Beispiel 1

Herstellung von klappentragenden Conduit-(Röhren) Trägern

[0051] Zum Herstellen des klappentragenden Conduit-Trägers wird ein nicht-gewebtes Polyglykolsäurepolymer (Fiberdurchmesser: 12–15 µm, Polymerdichte: 70 mg/ml, Albany International Research, Mansfield MA, USA.) verwendet. Das Polymer wird in der Art zugeschnitten, dass es eine Röhre mit 19 mm Durchmesser bildet. In diesen Conduit werden 3 dreieckige Segel eingefügt. Dieser Träger kann zum Herstellen von 3-segeligen Klappen, d. h. Pulmonal-, Aorten- und Tricuspidalklappen verwendet werden. Für Mitralklappen werden 2 Segel eingefügt.

Beispiel 2

Herstellung einer dreisegeligen von einer Rahmenkonstruktion stabilisierten Herzklappenprothese

[0052] Ein dreisegeliger klappentragender Conduit-Träger wird sterilisiert und in Medium (DM EM, GIBCO BRL-Life Technologies) für 24 Stunden eingelegt, um die Polymeroberfläche einzuweichen. Daraufhin wird der klappenförmige Träger pro Quadratmeter Oberfläche mit 4 Mio. Fibroblasten alle 90 Minuten insgesamt 6 mal besiedelt. Weiterhin wird der besiedelte Träger für 2 Wochen inkubiert (5% CO₂, 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit). Das Medium wird alle 4 Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt. Anschließend werden Endothelzellen auf den besiedelten klappenförmigen Träger aufgebracht (3–4 Mio. Endothelzellen pro Quadratmeter Oberfläche, 6 Besiedlungen alle 90 Minuten). Nach weiteren 2 Wochen wird das entstandene Gewebe über eine vorbereitete biologisch kompatible Rahmenkonstruktion gestülpt und mit der Rahmenkonstruktion durch eine Naht fest verbunden. Anschließend wird die gesamte Konstruktion in die Flusskammer des Bioreaktors unter sterilen Kautelen eingebracht und hier in Durchflussposition installiert. Der Bioreaktor wird nun mit Medium gefüllt und in den Zellinkubator gestellt. Nachdem über den Druckluftschlauch die Konnektion zur außerhalb des Inkubators stehenden Pumpe hergestellt wurde, wird mit minimalen pulsatischen Flüssen begonnen (50 ml/min). In 2-Tages-Schritten wird die Flussrate und Pulsrate gesteigert auf 100 ml/min (Puls 10), 300 ml (Puls 25), 700 ml (Puls 35), 1000 ml (Puls 60) für insgesamt weitere 4 Tage. Anschliessend (nach 14 Tagen) wird das nun gebildete Gewebe unter sterilen Bedingungen entnommen und zur biochemischen, histologischen und mechanischen Analyse asserviert.

Beispiel 3

Herstellung von dreisegeligen von einer mehrzipfeli-
gen Rahmenkonstruktion stabilisierten herzkappen-
förmigen Trägern

[0053] Zur Herstellung des herzkappenförmigen Trägers wird 1–2 mm dickes, nicht gewebtes Ko-Polymer aus Polyglycolsäure (PGA) und Polyhydroxyalkanoat (PHA) (Fiberdurchmesser 12–15 µm, Polymerdichte 70 mg/ml) verwendet und so zugeschnitten, dass ein 3,5 cm breites und 8,0 cm langes Band entsteht. Dieses Band wird an den Endpunkten unter Verwendung von resorbierbaren Nahtmaterial verbunden und zusätzlich an den Überlappungszonen unter Applikation von Hitze (60–70°C) verschweißt. Der nun entstandene Ring wird über eine dreizipfelige Rahmenkonstruktion (Dacron) gestülpt und mit dieser mittels Naht und unter Verwendung von Fibrinkleber verbunden. Nachfolgend wurden die einzelnen Herzklappensegel über das Rahmenkonstrukt wiederum unter Applikation von Hitze in die herzkappentypische, bauchige dreisegelige Form ausgeformt.

Beispiel 4

Herstellung einer dreisegeligen von einer dreizipfeli-
gen Rahmenkonstruktion stabilisierten Herzklappen-
prothese

[0054] Ein dreisegeliger von einer dreizipfeli-
gen Rahmenkonstruktion stabilisierten Träger wird sterili-
siert und in Medium (DM, EM, GIBCO BRL-Life Tech-
nologies) für 24 Stunden eingelegt, um die Polymer-
oberfläche einzuweichen. Darauf hin wird der klappen-
förmige Träger pro Quadratzentimeter Oberfläche mit
4 Mio. Fibroblasten alle 90 Minuten insgesamt 6 mal
besiedelt. Weiterhin wird der besiedelte Träger für 2
Wochen inkubiert (5% CO₂, 37°C, 95% Luftfeuchtig-
keit). Das Medium wird alle 4 Tage unter sterilen Be-
dingungen gewechselt. Anschließend werden Endo-
thelzellen auf den besiedelten klappenförmigen Trä-
ger aufgebracht (3–4 Mio. Endothelzellen pro Qua-
dratzentimeter Oberfläche, & Besiedelungen alle 90
Minuten). Anschließend wird die gesamte Konstrukti-
on in die Flusskammer des Bioreaktors unter sterilen
Kautelen eingebracht und hier in Durchflussposition
installiert. Der Bioreaktor wird nun mit Medium gefüllt
und in den Zellinkubator gestellt. Nachdem über den
Druckluftschlauch die Konnektion zur außerhalb des
Inkubators stehenden Pumpe hergestellt wurde, wird
mit minimalen pulsatischen Flüssen begonnen (50
ml/min.). In 2-Tages-Schritten wird die Flussrate und
Pulsrate gesteigert auf 100 ml/min. (Puls 10), 300 ml
(Puls 25, 700 ml (Puls 35), 1000 ml (Puls 60) für ins-
gesamt weitere 4 Tage. Anschliessend (nach 14 Ta-
gen) wird das nun gebildete Gewebe unter sterilen
Bedingungen entnommen und zur biochemischen,
histologischen und mechanischen Analyse asser-

viert.

Patentansprüche

1. In vitro-Verfahren zum Herstellen einer homo-
logenen Herzklappe, umfassend die folgenden Schritte:
– Bereitstellen eines biologisch abbaubaren Trägers
(Scaffold),
– Besiedeln des Trägers mit homologen Fibroblasten
und/oder Myofibroblasten zur Ausbildung einer bin-
degewebigen Matrix,
– ggfls. Besiedeln der bindegewebigen Matrix mit En-
dothelzellen
– Befestigen der Matrix auf einer nicht oder schwer
abbaubaren Rahmenkonstruktion (Stent),
wobei die ggfls. mit Endothelzellen besiedelte binde-
gewebige Matrix vor und/oder nach Befestigung auf
der Rahmenkonstruktion, in eine pulsatile Flusskam-
mer eingebracht wird, in der sie steigenden Flussra-
ten ausgesetzt werden kann, und die Flussrate konti-
nuierlich oder diskontinuierlich erhöht wird.

2. In vitro-Verfahren zum Herstellen einer homo-
logenen Herzklappe, umfassend die folgenden Schritte:
– Bereitstellen eines biologisch abbaubaren Trägers
(Scaffold), der mit einer nicht oder schwer abbauba-
ren Rahmenkonstruktion (Stent) fest verbunden ist,
– Besiedeln des Trägers mit homologen Fibroblasten
und/oder Myofibroblasten zur Ausbildung einer bin-
degewebigen Matrix,
– ggfls. Besiedeln der bindegewebigen Matrix mit
Endothelzellen
– Einbringen der Rahmenkonstruktion mit der damit
verbundenen bindegewebigen Matrix in eine pulsatile
Flusskammer, in der sie steigenden Flussraten aus-
gesetzt werden kann,
– kontinuierliches oder diskontinuierliches Erhöhen
der Flussrate.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2 ,
dadurch gekennzeichnet, dass der biologisch abbaubare
Träger eine biologisch abbaubare Polymermat-
rix oder eine azelluläre biologische Matrix ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, dass der Träger eine Poly-
glycolsäure (PGA), Polymilchsäure (PLA), Polyhy-
droxyalkanoat (PHA), Poly-4-Hydroxybutyrat (P4HB)
oder eine Mischung aus zwei oder mehreren dieser
Polymere umfasst.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, dass der Träger eine Poly-
merdichte von 40 bis 120 mg/cm³, bevorzugt 50 bis
80 mg/cm³ aufweist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, dass der Träger ein porö-
ses Polymer mit einer Porengröße von 80 bis 240 µm

ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Fasern des Trägers einen Durchmesser von 6 bis 20 μm , bevorzugt 10 bis 18 μm aufweisen.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger ein Bindegewebsgerüst einer animalen oder humanen Herzklappe ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt des Besiedelns mit Fibroblasten und/oder Myofibroblasten 3 bis 14 mal, bevorzugt 5 bis 10 mal wiederholt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass pro Quadratzentimeter Träger/Matrix und Besiedlungsschritt ca. 10^5 bis 6×10^8 Fibroblasten und/oder Myofibroblasten eingesetzt werden.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt des Besiedelns mit Endothelzellen 3 bis 14 mal, bevorzugt 5 bis 10 mal wiederholt wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass pro Quadratzentimeter Träger/Matrix und Besiedlungsschritt ca. 10^5 bis 5×10^8 Endothelzellen eingesetzt werden.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Fibroblasten und/oder Myofibroblasten und/oder Endothelzellen humane Zellen sind.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Fibroblasten und/oder Myofibroblasten und/oder Endothelzellen autologe Zellen sind.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Rahmenkonstruktion aus einem biokompatiblen nicht abbaubaren Material besteht.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Rahmenkonstruktion aus einem biokompatiblen schwer abbaubaren Material besteht.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Befestigung des Trägers auf der Rahmenkonstruktion mittels konventioneller Nahttechnik und/oder Fibrinkleber erfolgt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis

17, dadurch gekennzeichnet, dass der pulsatilem Flusskammer Flussraten von 5 ml/min bis 8000 ml/min, bevorzugt 50 bis 2000 ml/min eingestellt werden.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Flussrate über einen Zeitraum von 1 Woche bis 12 Wochen gesteigert wird.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die anfängliche Flussrate 50 bis 100 ml/min beträgt.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die anfängliche Pulsfrequenz 5 bis 10 Pulse/min beträgt.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Flussrate bis auf 5000 ml/min gesteigert wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Pulsfrequenz bis auf 180 Pulse/min gesteigert wird.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass in der pulsatilem Flusskammer systemische Drücke von 10 bis 240 mmHg eingestellt werden.

25. Autologe Herzklappe, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24 hergestellt wurde.

26. Autologe Herzklappe mit einer bindegewebigen inneren Struktur, die von einer Endothelzellschicht umgeben ist, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf einer nicht oder langsam abbaubaren Rahmenkonstruktion (Stent) befestigt ist.

27. Autologe Herzklappe nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass in dem bindegewebigen Kern eine Kollagendichte von 20 bis 60% gegeben ist.

28. Autologe Herzklappe nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass sie den Strömungsbedingungen im menschlichen Herzen standhält.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Abb. 1

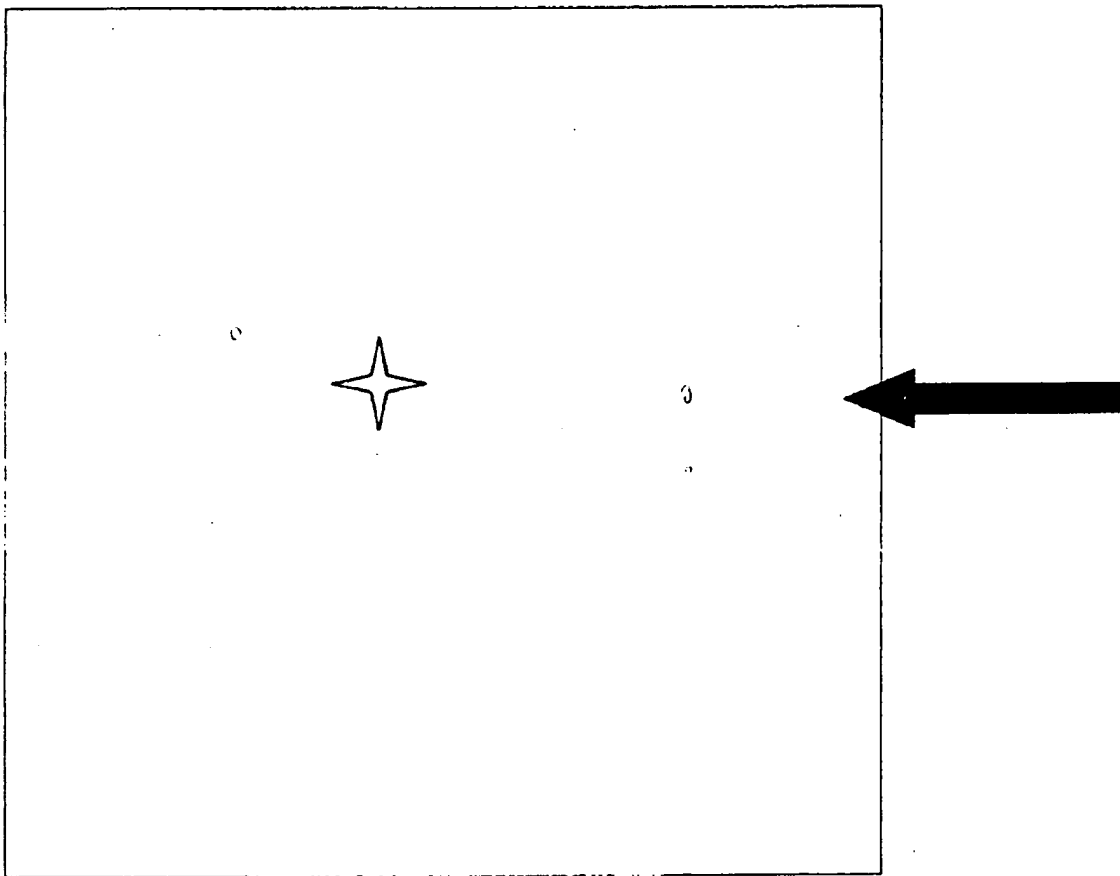
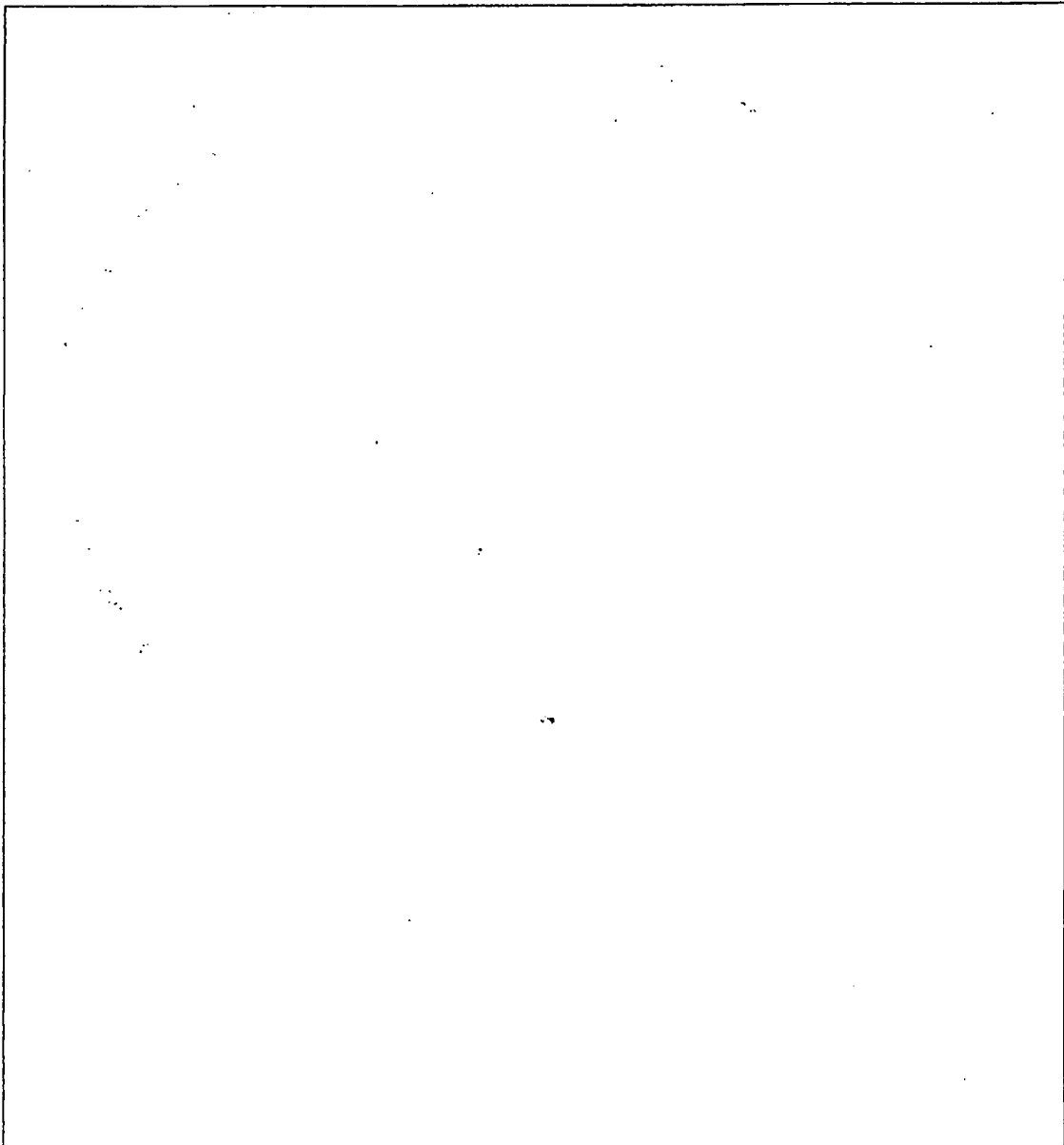
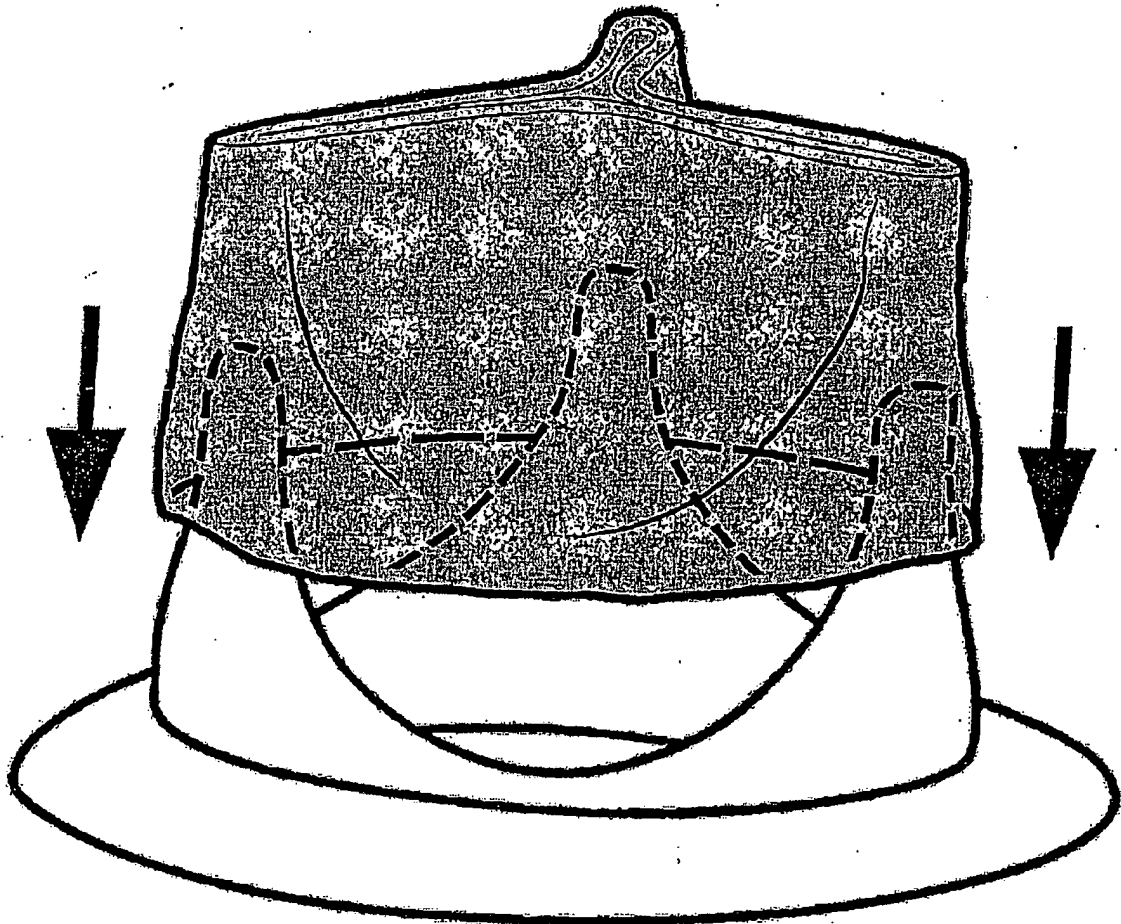


Abb. 2



Figur 3



DERWENT-ACC-NO: 2004-228446

DERWENT-WEEK: 200457

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: In vitro preparation of homologous
heart valves, useful
for replacement of diseased valves,
by inoculating
biodegradable carrier with
fibroblasts and attachment to
a non-degradable stent

INVENTOR: GREGOR, Z; PHILIPP, H S ; HOERSTRUP, S P ; ZUEND,
G

PATENT-ASSIGNEE: SYMETIS AG[SYMEN]

PRIORITY-DATA: 2002DE-1035237 (August 1, 2002)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PAGES	PUB-DATE	MAIN-IPC
AU 2002347023 A1		March 11, 2004	N/A
000	A61L	027/38	
DE 10235237 A1		February 12, 2004	N/A
012	C12N	005/08	
WO 2004018008 A1		March 4, 2004	G
000	A61L	027/38	

DESIGNATED-STATES: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ
CA CH CN CO CR CU CZ
DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP
KE KG KP KR KZ LC
LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT
RO RU SD SE SG SI
SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW AT BE
BG CH CY CZ DE DK
EA EE ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT
SD SE SK SL SZ TR
TZ UG ZM ZW

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
--------	-----------------	---------

APPL-DATE		
AU2002347023A1	N/A	
2002AU-0347023	September 4, 2002	
AU2002347023A1	Based on	WO2004018008
N/A		
DE 10235237A1	N/A	
2002DE-1035237	August 1, 2002	
WO2004018008A1	N/A	
2002WO-EP09906	September 4, 2002	

INT-CL (IPC): A61F002/24, A61L027/18 , A61L027/38 ,
A61L027/50 ,
A61L031/00 , C12N005/08

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 10235237A

BASIC-ABSTRACT:

NOVELTY - An in vitro method for preparing homologous heart valves (A), is new.

DETAILED DESCRIPTION - An in vitro method for preparing homologous heart valves

(A) comprises:

(a) preparation of a biodegradable carrier (scaffold);

(b) seeding the carrier with homologous fibroblasts and/or myofibroblasts to form a connective tissue matrix;

(c) optionally seeding the matrix with endothelial cells and

(d) fixing the matrix to a framework (stent) that is not (easily) degraded.

The matrix, before and/or after fixing, is introduced into a pulsatile flow chamber and the flow rate in the chamber increased (dis)continuously.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for:

(1) similar method in which the carrier and stent are fixed together before seeding with cells;

(2) autologous heart valves prepared by the method; and
(3) autologous heart valves having a connective tissue inner structure, surrounded by a layer of endothelial cells and fixed to a stent.

USE - The method is used to make heart valves for replacement of diseased valves.

ADVANTAGE - (A) Can withstand the flow conditions in the human heart and can be implanted simply, specifically without requiring suturing through the connective tissue core of the valve.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/3

TITLE-TERMS: VITRO PREPARATION HOMOLOGUE HEART VALVE USEFUL
REPLACE DISEASE
VALVE INOCULATE BIODEGRADABLE CARRY FIBROBLAST
ATTACH NON DEGRADE
STENT

DERWENT-CLASS: A96 B04 D16 D22 P32 P34

CPI-CODES: A12-V02; A12-V03B; B04-C03; B04-F02; B10-C04D;
B11-C08E1; B14-F01;
D05-H08; D05-H10; D09-C01C;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 *01*

Fragmentation Code

M417 M423 M431 M710 M720 M730 M782 M905 N136 N137

P522 Q233

Specific Compounds

A00I9T A00I9M A00I9N A00I9P A00I9S

Chemical Indexing M1 *02*

Fragmentation Code

H4 H401 H481 H8 J0 J014 J1 J171 J2 J273

M280 M313 M321 M322 M323 M331 M332 M340 M342 M349

M381 M393 M423 M431 M510 M520 M530 M540 M620 M710

M720 M730 M782 M904 M905 N136 N137 P522 Q233

Specific Compounds

24028T 24028M 24028N 24028P 24028S

Chemical Indexing M1 *03*

Fragmentation Code

H4 H401 H481 H8 J0 J011 J1 J171 M280 M311
M321 M342 M349 M381 M391 M416 M423 M431 M620 M710
M720 M730 M782 M904 M905 M910 N136 N137 P522 Q233

Specific Compounds

00448T 00448M 00448N 00448P 00448S 09538T 09538M 09538N
09538P 09538S

Registry Numbers

0448P 0448S 0448U

Chemical Indexing M1 *04*

Fragmentation Code

H4 H401 H481 H8 J0 J011 J1 J171 M280 M312
M321 M331 M340 M342 M349 M381 M391 M416 M423 M431
M620 M710 M720 M730 M782 M904 M905 M910 N136 N137
P522 Q233

Specific Compounds

00009T 00009M 00009N 00009P 00009S 06285T 06285M 06285N
06285P 06285S

Registry Numbers

0009P 0009S 0009U

Chemical Indexing M6 *05*

Fragmentation Code

M905 P522 Q233 R120 R150 R220 R522

UNLINKED-DERWENT-REGISTRY-NUMBERS: 0009P; 0009S ; 0009U ;
0448P ; 0448S ; 0448U

ENHANCED-POLYMER-INDEXING:

Polymer Index [1.1]

2004 ; R00448 G2108 D01 D11 D10 D50 D60 D82 F27 F26 F36
F35 ; P1978*R
P0839 D01 D50 D63 F41 ; H0000 ; S9999 S1183 S1161 S1070
; S9999
S1070*R

Polymer Index [1.2]

2004 ; R00009 G2108 D01 D11 D10 D50 D60 D83 F27 F26 F36
F35 ; P1978*R
P0839 D01 D50 D63 F41 ; H0000 ; S9999 S1070*R ; S9999
S1183 S1161
S1070

Polymer Index [1.3]

2004 ; G2120 G2108 D01 D60 F35 D11 D10 D51*R D63 D84
F27 F26 F89
F41 ; H0000 ; P1978*R P0839 D01 D50 D63 F41 ; S9999